



(51) 国際特許分類6 C07J 17/00	A1	(11) 国際公開番号 WO00/37481 (43) 国際公開日 2000年6月29日(29.06.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02550		(74) 代理人 弁理士 佐伯憲生(SAEKI, Norio) 〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo, (JP)
(22) 国際出願日 1999年5月17日(17.05.99)		(81) 指定国 CN, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)
(30) 優先権データ 特願平10/365560 1998年12月22日(22.12.98) JP		(添付公開書類 国際調査報告書)
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 科学技術振興事業団(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION)[JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama, (JP)		
(72) 発明者 ; および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 阪中雅広(SAKANAKA, Masahiro)[JP/JP] 〒791-0204 愛媛県温泉郡重信町大字志津川1191番地13 Ehime, (JP) 田中潤也(TANAKA, Junya)[JP/JP] 〒791-0203 愛媛県温泉郡重信町大字横河原1375 愛媛大学 横河原宿舎115号 Ehime, (JP) 佐藤康二(SATO, Kohji)[JP/JP] 〒433-8118 静岡県浜松市高岡西1-15-16 グレースウッズB-4 Shizuoka, (JP)		
(54) Title: BRAIN CELL OR NERVE CELL-PROTECTIVE AGENTS COMPRISING GINSENOSIDE Rb ₁		
(54) 発明の名称 ジンセノサイドRb ₁ からなる脳細胞又は神経細胞保護剤		
(57) Abstract Preparations for efficaciously administering ginsenoside Rb ₁ or its salt useful as cell-protective agents. More particularly, medicinal compositions for inhibiting apoptosis or apoptosis-like cell death or medicinal compositions for promoting the expression of a cell death inhibitory gene product Bcl-x _L which contain ginsenoside Rb ₁ or its salt; and preparations for intravenous administration which contain ginsenoside Rb ₁ or its salt. The above medicinal compositions contain ginsenoside Rb ₁ or its salt at a low concentration, preferably 1 ng/ml or less and still preferably 1 to 100 fg/ml. These compositions have effects of promoting the expression of the cell death inhibitory gene product Bcl-x _L and inhibiting apoptosis or apoptosis-like cell death. The above preparations for intravenous administration are useful in treating or preventing, in particular, brain and nervous diseases.		

(57)要約

本発明は、細胞保護剤として有用なジンセノサイドR b₁又はその塩の有効な投与用製剤を提供する。より詳細には、ジンセノサイドR b₁若しくはその塩を含有してなるアボトーシス又はアボトーシス様細胞死抑止用医薬組成物、又は、細胞死抑制遺伝子産物B c l - x₁の発現を促進させるための医薬組成物を提供するものである。また、本発明は、ジンセノサイドR b₁又はその塩を含有してなる静脈内投与用製剤を提供するものである。

本発明は、低濃度、好ましくは1ng/ml以下、より好ましくは1~10.0fg/mlのジンセノサイドR b₁又はその塩を含有してなる医薬組成物に関し、本発明の医薬組成物は細胞死抑制遺伝子産物B c l - x₁の発現を促進させ、また、アボトーシス又はアボトーシス様細胞死を抑止する作用を有する。さらに、本発明は、ジンセノサイドR b₁又はその塩を含有してなる静脈内投与用製剤に関し、特に脳・神経疾患の治療、予防又は処置のために有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スードーン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スウェーデン
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファン	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドavia	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサオ	共和国		TT	トリニダッド・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴー	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ベトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジニヤール	YU	ユーゴースラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

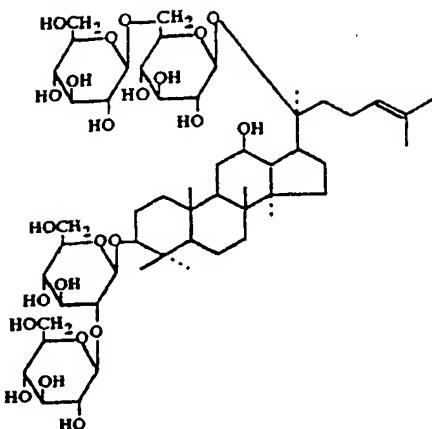
ジンセノサイドR b₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤技術分野

本発明は、細胞保護剤として有用なジンセノサイドR b₁又はその塩に関する。より詳細には、本発明は、ジンセノサイドR b₁若しくはその塩を含有してなるアボトーシス又はアボトーシス様細胞死抑止用医薬組成物、又は、ジンセノサイドR b₁若しくはその塩を含有してなる細胞死抑制遺伝子産物B c l - x₁の発現を促進させるための医薬組成物に関し、さらに詳細には、ジンセノサイドR b₁又はその塩を含有してなる静脈内投与用製剤である医薬組成物に関する。

背景技術

元来、脳卒中（脳血管障害）の治療法は、脳梗塞・脳塞栓・脳出血・一過性脳虚血発作・クモ膜下出血で異なっており、厳密には脳のCT検査を実施しなければ有効な対策が立てられないのが現状である。例えば血栓溶解剤などは脳梗塞・脳塞栓にのみ使用され、脳出血には禁忌とされている。しかし、脳卒中は可及的すみやかに病巣部位の神経細胞を保護する処置がとられなければ、以後永久に高次機能障害をもたらすかあるいは生命予後に影響を与える重篤な疾患であるので、一刻も早く治療を開始すべき疾患である。極論を言えば、脳のCT検査を実施している時間すら、脳卒中患者にとって回復する可能性を少なくする要因になるのである。まさに急性期脳卒中の治療は、脳卒中病変のみならず発症後の時間との戦いと言っても過言ではない。ただ残念ながら、目下の所、脳卒中の病型（脳梗塞・脳出血・脳塞栓・クモ膜下出血・一過性脳虚血発作）の如何を問わず、脳卒中を発症したと思われる患者に速やかに投与し、著効を示す薬物がほとんど存在しないのが実情である。

一方、ジンセノサイドR b₁は、下記構造式



で示される化合物であり、ジンセノサイドRb₁は柴田ら (Shibata S., et al., Economic and medicinal plant research, World Scientific, Philadelphia, pp 217-284, 1985) などにより公知の物質である。

ジンセノサイドRb₁は、向神經作用としてその腹腔内投与によりこれまで静穏作用のみが報告してきたが (Yoshimura H. et al., Eur.J.Pharmacol., 146, 291-297, 1988) 、その作用機序についてはまったく解明されていない。また、中枢神經系においては、ジンセノサイドRb₁とジンセノサイドRg₁の混合物（あるいは10⁻⁶Mから10⁻⁷Mの濃度のジンセノサイドRb₁またはジンセノサイドRg₁）がアセチルコリン含有神經細胞を活性化し、アルツハイマー病に効能を示す可能性があることが報告されている（米国特許：US,A,5,137,878: Composition and method for treatment of senile dementia）が、アセチルコリン細胞の機能障害がアルツハイマー病の主要所見であるとは言い難いので、この仮説には解決すべき問題が山積みしている。

しかも、ジンセノサイドRb₁単独の神經細胞保護作用については、本発明者らがジンセノサイドRb₁の研究を手掛けるまではほとんど解明されていなかった。本発明者らはこれまでジンセノサイドRb₁がアセチルコリン含有神經細胞以外にも保護効果を発揮するかどうかを、スナネズミの一過性前脳虚血モデルを用いて調べてきた。この脳虚血モデル動物では、脳温を37°Cに維持した状態で3分間から5分間、総頸動脈血流を遮断すると、血流遮断時間に応じて虚血後一週間以内に海馬CA1錐体神經細胞（アセチルコリン非含有）が変性脱落し（これを遅

発性神経細胞死という）、同動物の学習行動機能も低下することが証明されている（Wen T.-C. et al., Acta Neuropathol., 91, 15-22, 1996）。すなわち、スナネズミの一過性前脳虚血モデルはヒトの一過性脳虚血発作の病態を反映すると言える。

本発明者らは、スナネズミの腹腔内にあらかじめジンセノサイドRb₁（10 mg/kgまたは20 mg/kg）を1日単回1週間注入しておくと、5分間の総頸動脈血流遮断による遅発性神経細胞死と学習行動障害が有意に軽減されることを証明した（Wen T.-C. et al., Acta Neuropathol., 91, 15-22, 1996）。しかしながら、5分間あるいは3分間の総頸動脈血流遮断直後に、ジンセノサイドRb₁を腹腔内に注入しても効果はみられなかった（Wen T.-C. et al., Acta Neuropathol., 91, 15-22, 1996; Lim J.-H. et al., Neurosci. Res., 28, 191-200, 1997）。従って、この時点で末梢（腹腔内）投与されたジンセノサイドRb₁の脳内移行率および移行速度は非常に低いことが予想されたため、ジンセノサイドRb₁は海馬CA1錐体神経細胞の保護という観点からは、臨床応用の可能性は皆無と考えられた。

前記のような末梢（腹腔内）投与に代えて、ジンセノサイドRb₁を3分間あるいは3.5分間の総頸動脈血流遮断の直後に、直接脳室内に持続注入すると遅発性神経細胞死と学習行動障害が抑止されることが報告されている（Lim J.-H. et al., Neurosci. Res., 28, 191-200, 1997）。さらに、脳卒中易発症高血圧自然発症（S H - S P）ラットの中大脳動脈皮質枝（M C A）永久閉塞モデル（脳梗塞ラット）においても、ジンセノサイドRb₁をM C A永久閉塞直後より脳室内へ持続注入すると、大脳皮質梗塞巣が有意に縮小し、同動物の場所学習障害も軽減されることが判明した（Zhang B. et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998）。

しかしながら、他のペプチド性成長因子と同様に（Sakanaka M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 4635-4640, 1998; Wen T.-C. et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998）、たとえジンセノサイドRb₁が脳室内直接投与で効果を示しても投与経路の問題からやはりヒトの一過性脳虚血発作や脳梗塞症例にジンセノサイドRb₁を応用することは不可能と考えられた。

また、ジンセノサイドRb₁の末梢（腹腔内）投与による神経細胞保護作用のメカニズムについて、本発明者らはこれまでに低濃度（1～100 fg/ml）の

同薬物をあらかじめ培養液に混入しておくと、ヒドロキシルラジカル誘発剤（硫酸第一鉄）による神経細胞の壊死（ネクローシス）が軽減されることを報告している（Lim J.-H. et al., Neurosci. Res., 28, 191-200, 1997; Zhang B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998）。本発明者らは、ジンセノサイドRb₁がヒドロキシルラジカルを消去することにより、細胞膜の過酸化脂質を減少せしめ、培養神経細胞を保護するものと推測してきたが、これまでにこの仮説を証明した報告はみられない。

また、高濃度（0.11～11 μg/ml）のジンセノサイドRb₁が、グルタミン酸の神経毒性を軽減して神経細胞死を予防すること（Kim Y.-C., et al., J. Neurosci. Res., 53, 426-432, 1998）、あるいは500 μM（550 μg/ml）という高濃度のジンセノサイドRb₁がアポトーシス様神経細胞死を予防する可能性があること（田中知明ら, The Ginseng Review, 24, 61-65, 1998）が培養実験で報告されているが、高濃度のジンセノサイドRb₁は本発明者らの培養実験によればかえって神経毒性を示すことが判明している（Lim J.-H., et al., Neurosci. Res., 28, 191-200, 1997; Zhang B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998）。

しかも、このように高濃度のジンセノサイドRb₁を生体内の細胞外液で再現することは極めて困難であるのみならず、コスト面や副作用出現の可能性を考えても大量のジンセノサイドRb₁を生体に投与することは不可能である。実際、これまでの本発明者らの実験結果からも、高用量のジンセノサイドRb₁は生体にとつて必ずしも好ましい効果・効能をもたらさないことが判明している（Zhang B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998）。

すなわち、ジンセノサイドRb₁による神経細胞保護作用のメカニズムはいまだ充分に解明されていないというのが現状である。もし、ジンセノサイドRb₁の作用機構解明がなされれば、同薬物の新たな効能・利用可能性が発掘されることが期待される。また、ジンセノサイドRb₁が生体でアポトーシス様細胞死を実際に抑止するかどうかは明らかにされていない。

本発明者らは、ジンセノサイドRb₁が1 fg/mlから100 fg/mlという世界に類をみない低濃度域で、細胞死抑制遺伝子産物Bcl-xLの発現増加を

促すことによりアポトーシス様神経細胞死を抑止することを見出した。すなわち、本発明でジンセノサイドR_bは世界で唯一の非ペプチド性のBcl-xL発現増加剤であることが見出された。また、100 fg/mlの濃度ではわずかにジンセノサイドR_bの過酸化脂質生成抑制効果はみられたが、それよりも低い濃度域ではそのような効果はみられなかった。従って、ジンセノサイドR_bの作用機構に関する従来の仮説は妥当でないことが判明した。さらに、生体内においても、ジンセノサイドR_bがアポトーシス様神経細胞死を抑止することを見出し本発明を完成した。

本発明者らは、ジンセノサイドR_bが静脈内投与により、これまでまったく予想すらされなかつた優れた脳梗塞抑止作用ならびに場所学習障害改善作用を示すことを見出し、本発明を完成した。

本発明の目的は静脈内投与により優れた脳梗塞治療効果ならびに脳血管性痴呆抑止作用を示し、かつ細胞死抑制遺伝子Bcl-xLの発現を促すことにより細胞を保護する薬物を提供することである。

また、本発明は、細胞保護剤として有用なジンセノサイドR_b又はその塩の有効な投与用製剤を提供する。より詳細には、ジンセノサイドR_b若しくはその塩を含有してなるアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物、又は、ジンセノサイドR_b若しくはその塩を含有してなる細胞死抑制遺伝子産物Bcl-xLの発現を促進させるための医薬組成物を提供するものである。また、本発明は、ジンセノサイドR_b又はその塩を含有してなる脳・神経疾患の治療、予防又は処置などのために有用な静脈内投与用製剤を提供するものである。

発明の開示

本発明は、低濃度のジンセノサイドR_b又はその塩を含有してなるアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物に関する。

また、本発明は、ジンセノサイドR_b又はその塩を含有してなる細胞死抑制遺伝子産物Bcl-xLの発現を促進させるための医薬組成物に関する。

これらの本発明の医薬組成物は、静脈内投与用製剤が好ましいが、他の任意の

投与経路を採用することも可能である。

さらに、本発明は、ジンセノサイドR b₁又はその塩を、好ましくは低濃度で含有してなる脳・神経疾患の治療、予防又は処置などのための医薬組成物、好ましくは静脈内投与用製剤に関する。

また、本発明は、前記の静脈内投与用製剤からなる脳・神経疾患の治療、予防若しくは処置剤、又は、脳細胞若しくは神経細胞保護剤、これらの疾患の治療、予防又は処置方法、及びこれらの医薬を製造するためのジンセノサイドR b₁又はその塩の使用に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、水迷路テストの結果を示す図である。第1図の左側は2週目の結果であり、同右側は4週目の結果である。また、第1図中の黒丸印（●）は偽手術をしたラットのものであり、白丸印（○）は手術後、生理食塩水のみを投与したものであり、黒四角印（■）はジンセノサイドR b₁を6μg／日投与したものであり、白四角印（□）はジンセノサイドR b₁を60μg／日投与したものである。

第2図は、大脳皮質梗塞比率を示す図である。

第3図は、大脳皮質梗塞巣の写真である。Aが生理食塩水投与例BがジンセノサイドR b₁投与例である。

第4図は、後述の実施例1の結果をまとめた模式図である。

第5図は、ジンセノサイドR b₁の膜脂質過酸化防止効果が非常に弱いことを示す図である。

第6図は、ジンセノサイドR b₁がニトロブルシッドナトリウム（S N P）による神経細胞死（アボトーシス）を抑止することを示すグラフである。第6図の左側は、S N P処理のない場合の結果を示し、右側はS N P処理を行った場合のものであり、黒く塗りつぶされているものはS N P処理の前後にジンセノサイドR b₁が添加されたものであり、斜線が引かれているものは、S N P処理後にジンセノサイドR b₁が添加されたものである。

第7図は、ジンセノサイドR b₁によるB c l - x₁のm R N Aの発現増強効果を示す、図面に代わる写真である。

第8図は、ジンセノサイドRb₁によるBcl-x_Lの蛋白質に対するウエスタンプロッティングの結果を示す、図面に代わる写真である。

第9図は、ジンセノサイドRb₁によるBcl-x_Lの蛋白質に対するウエスタンプロッティングの結果を定量化したグラフである。

第10図の(A)、(B)及び(C)は、ジンセノサイドRb₁が成熟脳において病的なアポトーシス様神経細胞死を抑止することを示す、図面に代わる写真である。第10図の(D)は、その結果を定量化したグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明のジンセノサイドRb₁は、前記した構造式で示されるものであり、ジンセノサイドRb₁は、例えば、柴田らの方法 (Shibata S. et al Economic and medicinal plant research, World Scientific, Philadelphia, pp 217-284, 1985) に準じて分離・精製することができる。このような方法により精製されたものは、その純度が98%以上であることが、薄層クロマトグラフィーならびに核磁気共鳴スペクトルにより確認されている (Kawashima Y. and Samukawa K., J.Med.Pharmacol.Soc.Wakan-Yaku, 3, 235-236, 1986)。本発明のジンセノサイドRb₁は、高純度のものを使用するのが好ましいが、薬用人参などのジンセノサイドRb₁を含有する天然物からの抽出混合物を使用することもできる。

本発明のジンセノサイドRb₁は、遊離のものを使用することもできるが、それを適当な塩として使用することもできる。また、それらの水和物のような溶媒和物として使用することもできる。

本発明で使用されるジンセノサイドRb₁の濃度は、低濃度が好ましく、より具体的には、細胞外液濃度が1ng/ml以下、好ましくは1pg/ml以下、より好ましくは100fg/ml以下となる濃度である。本発明のジンセノサイドRb₁を、静脈内投与用製剤として使用する場合にも、患者の患部における細胞外液濃度が前記の濃度になるように製剤を調製することが好ましい。本発明の医薬組成物や製剤は、患部の細胞外液濃度が1~100fg/ml程度の濃度であっても充分な効果が得られる。低濃度でのジンセノサイドRb₁の使用が好ましい点が本発明の特徴のひとつである。

本発明の別の特徴は、ジンセノサイドR b₁を静脈内投与用製剤として使用する点である。驚くべきことに、静脈内投与されたジンセノサイドR b₁は、従来の末梢（腹腔内）投与によるものとは異なり、脳・神経系に速やかに伝達されることを見出したことである。本発明の静脈内投与用製剤は、血管内、好ましくは静脈に直接投与できるものであればよく、単回静脈内注入用製剤であっても、静脈内持続投与用製剤であってもよい。また、点滴用組成物などの静脈投与製剤に添加して使用できる剤型であってもよい。

本発明のジンセノサイドR b₁は、静脈内投与で脳梗塞巣を非投与群の1/4程度にまで縮小させ、しかも細胞死抑制因子B c l - x₁発現増強というユニークな作用機序を有し、脳の神経細胞を保護するものであり、急性期・慢性期の脳梗塞のみならず脳出血・クモ膜下出血・脳塞栓の急性期や慢性期あるいは一過性脳虚血発作に対しても、神経保護薬として利用することができる。

すなわち、本発明のジンセノサイドR b₁は脳卒中が疑われる患者に対して救急車の中でも点滴静注が可能な薬物である。脳虚血という病態は脳梗塞のみならず、心不全、重症貧血、呼吸障害、心停止、心室細動に伴って生じることが知られている。これらの疾患から脳を守り患者の予後を改善するためにも、本発明のジンセノサイドR b₁からなる医薬組成物は極めて有効なものである。

また、本発明のジンセノサイドR b₁からなる医薬組成物は、アポトーシス様神経細胞死を伴うその他の一次性および二次性神経変性疾患（アルツハイマー病、ピック病、脊髄小脳変性症、パーキンソン病、舞蹈病、縁内障、老人性黄斑変性症、筋萎縮性側索硬化症、エイズ脳症、肝性脳症、脳炎、脳性マヒ、網膜色素変性症、頭部外傷、脊髄損傷、一酸化炭素中毒、網膜剥離、新生児仮死、糖尿病性網膜症、末梢神経障害、等）などにも、B c l - x₁蛋白質発現増強を介して効能を示すことが期待される。

さらに、本発明のジンセノサイドR b₁の薬剤としての特徴で、今一つ見逃せないのが、これと言った副作用を示さない点である。たとえば、一酸化窒素供与体であるニトロブルシッドナトリウム（S N P）処理をしていない通常の培養神経細胞にジンセノサイドR b₁を添加しても代謝活性にまったく影響を与えず、S N P処理をして傷害を受けた神経細胞のみを低濃度（1～100 f g / m l）のジ

ンセノサイドR b₁が保護するので（実施例3参照）、ジンセノサイドR b₁は正常な神経組織の機能にはあまり影響を与えず、病変部にのみ好ましい効果を発揮することができる。この点は、神経保護薬として開発途上にあるグルタミン酸受容体拮抗薬よりもはるかに優れた特性といえる。

また、ジンセノサイドR b₁の脳室内投与により脳温、脳血流、血圧にも影響が及ばないこともすでに報告されている（Lim J.-H. et al Neurosci. Res., 28, 191-200, 1997; Zhang B. et al J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998）。もちろん、本発明者らが、今回の各実験例において、本発明のジンセノサイドR b₁を投与した動物を注意深く観察した範囲内でも、副作用は検出されなかった。

本発明のジンセノサイドR b₁はMCA永久閉塞ラット（体重約300g）において、1日量6μgおよび60μgの投与で脳梗塞巣を縮小せしめ、場所学習障害（脳血管性痴呆）を改善するという実験結果に基づけば、体重60kgのヒト脳卒中患者に投与する量は、体重あたりで計算すると1日当たり1.2mgから12mgということになる。しかし、一般に動物の体重が増加するにつれて体重当たりの必要薬物投与量が減少することから、1.2mg以下の用量でも充分効能を示すと考えられる。本発明の医薬組成物のヒト脳卒中患者での1日当たりの投与量としては、患者の個人差や病状にもよるが、0.1mg以上、好ましくは1mg以上、より好ましくは10mg以上である。本発明の医薬組成物は副作用が少なく、投与量の上限としてはかなり多量にすることもできるが、1日当たり1g以下、好ましくは0.1g以下である。

本発明の医薬組成物の投与方法としては、静脈投与が好ましく、前記した投与量を断続的又は連続的に投与することができる。本発明の有効成分であるジンセノサイドR b₁はサボニンの1種であり、通常の方法により製剤化することができる。例えば、本発明の水溶性医薬組成物は、凍結乾燥結晶を生理食塩水、蒸留水、リン酸緩衝液、ブドウ糖液等に溶解することにより静脈投与製剤とすることができる。脂肪乳剤、リポソーム製剤としても使用可能である。静脈投与するときの製剤の濃度としては余り高濃度でない限り任意の濃度に調整することができ、例えば、0.01～10mg/ml、好ましくは0.1～1mg/ml程度にして投与することができる。

また、本発明における動物実験においては、左中大脳動脈皮質枝（MCA）永久閉塞後、28日間にわたって、ジンセノサイドRb₁を静脈内へ持続注入したが、実際の急性期脳卒中症例では、発症後2週間以内に病変が進行することが多いので、この期間だけでもジンセノサイドRb₁を投与すれば充分効果が期待できる。また、ジンセノサイドRb₁の実用化により、脳卒中患者の脳血管再建術・再灌流術の適応も広がるものと考えられる。

本発明は、過去に類を見ない低濃度でジンセノサイドRb₁が、Bcl-xL蛋白質の増加を促すことによりアポトーシスあるいはアポトーシス様細胞死を抑止することを世界に先がけて報告するものである。低濃度でジンセノサイドRb₁が、Bcl-xL蛋白質の増加を促すことによりアポトーシスあるいはアポトーシス様細胞死を抑止するということは、ジンセノサイドRb₁が単に中枢神経疾患のみならずアポトーシスを伴う末梢組織の疾患（たとえば、臓器移植後の拒絶反応、心筋・肝臓・腎臓の虚血再灌流障害、心筋梗塞、末梢動脈閉塞症、末梢循環不全、褥創、自己免疫病、免疫不全病）にも有効であることを物語っている。しかも、これら末梢組織の疾患に対しては、神経疾患に使用される用量よりも少ない量のジンセノサイドRb₁で充分な効果・効能が発揮される。

次に本発明の低濃度でのジンセノサイドRb₁の作用について詳細に説明する。まず、本発明者らは、ジンセノサイドRb₁の静脈内注入による作用を検討した。このために、例えば、12～13週齢の雄性SH-SPラット（体重250～300g）を使用した。同動物は12時間ごとの明暗サイクル室で飼育し、水ならびに餌は自由摂取とした。同動物の左中大脳動脈皮質枝（MCA）を凝固・切離した。ジンセノサイドRb₁をMCA永久閉塞直後に単回静脈内注入し（6μgまたは60μg）、その後アルザミニ浸透圧ポンプを用いて28日間静脈内へ持続注入（6μg/日または60μg/日）した。

なお、MCAを閉塞した対照動物（虚血コントロール動物）と、偽手術をした動物には同量の生理食塩水のみを投与した。

MCA永久閉塞後、常法に従って（Zhang B., et al., J. Stroke Cerebrovasc.

Dis., 7, 1-9, 1998) 2週目と4週目にそれぞれ4日間水迷路テストを実施し、SH-S Pラットの場所学習能力を判定した。

その結果を第1図に示す。第1図の左側は2週目の結果であり、同右側は4週目の結果である。また、第1図中の黒丸印(●)は偽手術をしたラットのものであり、白丸印(○)は手術後生理食塩水のみを投与したものであり、黒四角印(■)はジンセノサイドR b₁を6μg/日投与したものであり、白四角印(□)はジンセノサイドR b₁を60μg/日投与したものである。

第1図のことくMCA永久閉塞後(脳梗塞後)の場所学習障害が、生理食塩水注入脳梗塞群に比べて有意に改善された。特に、MCA閉塞後2週目と4週日の水迷路テストで、ジンセノサイドR b₁の低用量では各々3日目と4日目の試行において、ジンセノサイドR b₁の高用量では2週目の4日目および4週目の3日目、4日目に有意な学習能力改善効果を示した。また、4週目の初日にも高用量・低用量とも有意な効果が確認された。なお、SH-S Pラットの水泳速度には各群で有意差はみられなかった。

4週目の水迷路テスト終了後に、SH-S Pラットを抱水クロラールにて麻酔し、4%バラホルムアルデヒドを含有する0.1モルリン酸緩衝液で経心的に灌流固定した。その後、同動物の脳を摘出し大脳皮質梗塞巣の写真を撮影した。左大脳半球面積と左大脳皮質梗塞面積を、写真上で画像解析装置を用いて計測し、左大脳皮質梗塞面積を左大脳半球面積で除することにより大脳皮質梗塞比率(%)を算出した。その結果を第2図に示す。

第2図に示されるごとく、ジンセノサイドR b₁静脈内投与脳梗塞群で生理食塩水投与脳梗塞群に比して、大脳皮質梗塞比率も有意に減少していた。この大脳皮質梗塞比率は梗塞面積をもとに算出したものであるが、その比率の平均値がジンセノサイドR b₁静脈内投与群で生理食塩水投与群の50%以下に低下していることから、実際の梗塞体積は、ジンセノサイドR b₁の静脈内投与により4分の1程度に縮小したことになる。

第3図Aに生理食塩水投与脳梗塞巣、第3図BにジンセノサイドR b₁(6μg/日)投与脳梗塞巣の実例を示す。

また、第4図に本実験結果をまとめた模式図を示す。生理食塩水投与群では脳

梗塞病巣部の大きさが大きいままであり、水迷路テストにおいては目的のプラットホームに到達するまでに時間を要しているのに対して、本発明のジンセノサイドRb₁投与群においては病巣部が回復、縮小されており、この結果水迷路テストにおいては目的のプラットホームに短時間で到達している。

スナネズミの一過性前脳虚血モデルを用いた従来の論文 (Wen T.-C., et al., *Acta Neuropathol.*, 91, 15-22, 1996) では、ジンセノサイドRb₁の腹腔内投与 (10 mg/kg/日または20 mg/kg/日) を虚血負荷前に実施しても、約30%の海馬CA1錐体神経細胞しか救うことができなかった。もちろん、ジンセノサイドRb₁をスナネズミ腹腔内に虚血後に投与してもまったく効果はなかった。しかも、腹腔内投与されたジンセノサイドRb₁の一日量は、スナネズミの体重 (70 g前後) から判断すると、0.7 mgから1.4 mgという高用量であるので、ジンセノサイドRb₁の投与効率・効能という観点から判断しても、ジンセノサイドRb₁の静脈内投与は腹腔内投与よりもはるかに優れた投与方法であり、ヒトへの応用が容易である。周知のことく、ヒトで薬物を腹腔内に投与する方法はごく一部の例外 (腹膜灌流等) を除いてはほとんど実施されていない。

また、本実施例に用いたMCA永久閉塞動物 (脳梗塞ラット) は明らかに、スナネズミの一過性前脳虚血モデルよりも重篤でありかつヒトの病態に近いモデルである。従って、このMCA永久閉塞動物において、ジンセノサイドRb₁を脳血管閉塞後に静脈内投与して著効を示したということは、ジンセノサイドRb₁少量静脈内注入の有用性、利便性、経済性を明らかにしている。

一方、MCA永久閉塞動物の脳室内に直接ジンセノサイドRb₁を注入してその効果を調べた従来の論文では (Zhang B., et al., *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, 7, 1-9, 1998) 、MCA閉塞後に0.6 μg/日の用量でジンセノサイドRb₁を脳室内へ持続注入したときのみに有意な脳梗塞抑止効果がみられたが、その効果は本実施例で示したジンセノサイドRb₁静脈内投与の効果と同等ないしそれより少し劣るものであった。また、ジンセノサイドRb₁脳室内投与についての前掲の論文において、その他の用量 (6 μg/日、0.06 μg/日) でMCA永久閉塞後にジンセノサイドRb₁を脳室内へ持続注入してもまったく脳梗塞抑止効果はみられなかつたので、ジンセノサイドRb₁脳室内投与の有効濃度域は極めて狭く、実

用化は困難と考えられた。しかも、ヒトへの応用を考慮したとき、ジンセノサイドRb₁の脳室内注入はその危険性と効能を斟酌した場合、現実的に実施することは不可能と判断される。

一般に、神経保護因子は脳室内あるいは脳実質内に直接投与した場合に最も大きな効果を発揮し、静脈内投与や腹腔内投与をした場合には、脳血液閥門に遮断されてその効果・効能が激減あるいは消失すると考えられる。従って、ジンセノサイドRb₁に関しても、その腹腔内投与や脳室内投与実験結果から判断して、静脈内投与の効果・効能はまったく予想されていなかった。

しかし、本実験例であきらかにされたごとく、ジンセノサイドRb₁の静脈内投与は脳室内投与の場合よりも広い濃度域でMCA永久閉塞ラットの脳梗塞巣をより効果的に縮小せしめ、同動物の学習能力を改善することが発明された。また、ジンセノサイドRb₁は薬用人蔘中に含有される精製サボニンであるが、経口投与により血中ではまったく検出されないため事実上ジンセノサイドRb₁自体の薬理作用は否定されてきた。従って、本実施例により静脈内投与されたジンセノサイドRb₁が薬用人蔘とは独立した効果・効能・用途をもつことが明らかにされた。

次に、本発明者らはジンセノサイドRb₁による神経細胞膜脂質の過酸化防止効果判定の実験を行った。

ベンら (Peng H. et al., J.Cereb.Blood Flow Metab., 18, 349-360, 1998) の方法にしたがって、胎生17日目ラット大脳皮質神経細胞を、無血清培養液中で3日間維持した後、ジンセノサイドRb₁を含むまたは含まない新鮮な培養液に交換し、さらに48時間培養した。その後、硫酸第一鉄とアスコルビン酸を含みジンセノサイドRb₁を含まない新鮮な培養液に交換して2時間維持し、ヒドロキシリラジカルを発生させ神経細胞膜に酸化傷害を与えた。產生した神経細胞膜過酸化脂質は、ドデシル硫酸ナトリウムにより細胞を溶かしたのち、チオバルビツール酸 (TBA) の固定量を吸光度測定することにより求められた。

本実験の目的は、ジンセノサイドRb₁が硫酸第一鉄による神経細胞壞死 (ネクローシス) を抑止する濃度域 (0.1 ~ 100 f g / m l) で細胞膜脂質の過酸化を防止するかどうか検討することである。

その結果を第5図に示す。この実験結果から、ジンセノサイドRb₁による神経細胞膜脂質過酸化防止効果は100 fg/mlの濃度でのみわずかに認められたが、硫酸第一鉄のフリーラジカル障害を軽減する0.1~10 fg/mlの濃度域では、脂質過酸化防止効果は認められなかった。従って、ジンセノサイドRb₁は従来の論文 (Lim J.-H., et al., Neurosci. Res., 28, 191-200, 1997; Zhang B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998) のごとく0.1~100 fg/mlの濃度域でフリーラジカルの神経毒性を軽減することは間違いないが、それに続いて過酸化脂質産生をも抑制するという従来の仮説は正しくないということが判明した。従って、ジンセノサイドRb₁の新たな作用機構の解析が必要とされることを本実験は明らかにするものである。

このために、本発明者らは、ジンセノサイドRb₁による神経細胞死（アポトーシス）の抑止作用を判定するための実験を行った。

細胞死はその形態学的特徴よりネクローシスとアポトーシスに大別されている。ただ、神経細胞死に関しては、ネクローシスという概念は定着しているものの、一方のアポトーシスについては、病的成熟脳で類似の現象は観察されるがリンパ球にみられるような典型的特徴を示すものが非常に少ない。従って、本明細書ではネクローシスとは異なり緩徐に進行する神経細胞の死を“神経細胞のアポトーシス”あるいは“アポトーシス様神経細胞死”と定義することにする。

本発明者らは、最近培養神経細胞を一酸化窒素供与体ニトロブルシッドナトリウム (SNP) に短時間暴露すると神経細胞のアポトーシスが誘導されることを見出した (Toku K., et al., J. Neurosci. Res., 53, 415-425, 1998)。この培養実験では典型的なアポトーシスの特徴が観察されたので、本実験系を用いてジンセノサイドRb₁のアポトーシス抑止効果を判定することにした。

胎生17日目ラット大脳皮質神経細胞を無血清培地中に4日間ないし5日間維持した後、ジンセノサイドRb₁を含むまたは含まない新鮮な培地に交換し、24時間培養した。その後、SNPを100 μMの濃度で培地中に10分間添加した。その後、さらにジンセノサイドRb₁を含む培養液中で16時間神経細胞を維持し、細胞生存率を酸化還元色素のアラマーブルーを用いて測定した。

前述の硫酸第一鉄負荷実験ではジンセノサイドRb₁をあらかじめ培地中に投与

しておいてからその結果を判定したが、本実験では S N P 負荷前後および負荷後にジンセノサイド R b₁を培地中に添加し、その効果を調べた。

その結果を第 6 図に示す。第 6 図の右側は S N P 处理を行った場合のものであり、黒く塗りつぶされているものは S N P 处理の前後にジンセノサイド R b₁が添加されたものであり、斜線が引かれているものは、S N P 处理後にジンセノサイド R b₁が添加されたものである。

第 6 図に示されることく、一酸化窒素供与体ニトロブルシッドナトリウム (S N P) の処理がないときには、ジンセノサイド R b₁は、培養神経細胞の代謝活性に有意な影響を与えない。S N P 处理を行うと、神経細胞死（アポトーシス）が起こるが、ジンセノサイド R b₁は 1 ~ 1 0 0 f g / m l の濃度域で S N P 处理前後および処理後に投与した場合でも神経細胞のアポトーシスを有意に抑制することが判明した。

ジンセノサイド R b₁が、細胞外液濃度で 1 ~ 1 0 0 f g / m l という過去に類を見ない低濃度で神経細胞のアポトーシスを抑制することを証明した本実験結果は、ジンセノサイド R b₁を病的なアポトーシス様神経細胞死の治療に利用しうることを世界に先がけて実証したものである。

次に、ジンセノサイド R b₁の B c l - x₁発現に対する作用を解析するための実験を行った。

B c l - x₁遺伝子は成熟脳、免疫系組織、循環系組織を始めとする多くの組織に発現しており、細胞が生存する上で重要な役割を果たしていることが証明されている (Adams J.M. and Cory S., Science, 281, 1322-1326, 1998; Boise, L.H., et al., Cell, 74, 597-608, 1993; Gottschalk A.R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 91, 7350-7354, 1994; Gonzalez-Garcia M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 4304-4308, 1995)。

そこで、本発明のジンセノサイド R b₁が B c l - x₁遺伝子の発現を増加させるかどうかを調べた。実験手技は温らの論文 (Wen T.-C., et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998) に準じた。0 f g / m l 、 1 f g / m l 、 及び、 1 0 0 f g / m l のジンセノサイド R b₁で、 2 4 時間前処理された培養神経細胞から総 R N A を抽出した。D N a s e 処理済の総 R N A 3 μ g から、オリゴ d T プライマー

と逆転写酵素 (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase) を用いてcDNAを生成した。遺伝子増幅反応 (PCR) はTaqポリメラーゼを用いて以下の条件で行った。すなわち、(1) 94°C、2分間、(2) 94°C、1.5分間；55°C、1.5分間；72°C、2分間を1サイクルとし、Bcl-xLに関しては25サイクル、β-アクチンに関しては20サイクル、(3) 72°C、2分間である。

PCR産物を、3%アガロースゲルにて泳動し、エチジウムプロマイド染色によって可視化した。なお、内部標準としてβ-アクチンのmRNAの発現を用いた。その結果を第7図に示す。

また、Bcl-xL蛋白質の神経細胞での発現をジンセノサイドRb₁が増強するかどうか調べるため、抗Bcl-xL蛋白質抗体を用いてウエスタンプロット法を実施した。ジンセノサイドRb₁存在下または非存在下で、ラット大脳皮質神経細胞を48時間培養後、電気泳動用サンプル緩衝液で細胞を溶解し、電気泳動を実施した。その後泳動物をニトロセルロース膜に転写しウエスタンプロットを行った。その結果を第8図に示す。

さらに、抗Bcl-xL蛋白質抗体と反応するバンドを画像解析装置で定量化した。その結果を第9図に示す。

第7図に示すことく、1fg/mlあるいは100fg/mlのジンセノサイドRb₁で処理された培養神経細胞では、Bcl-xLのmRNAの発現がコントロールに比べて増加していた。一方、ジンセノサイドRb₁は神経細胞死抑止効果を発揮する1～100fg/mlの濃度域で、神経細胞のBcl-xL蛋白質発現量を約50%有意に増加せしめた（第8図、第9図）。

神経細胞におけるBcl-xL蛋白質の発現増強を促す生理活性物質としてこれまで0.6～15.0ng/mlの濃度域のインターロイキン3が報告されているが（Wen T.-C., et al., J.Exp.Med., 188, 635-649, 1998）、ジンセノサイドRb₁のBcl-xL蛋白質の発現促進作用は、インターロイキン3よりもはるかに低濃度で発揮され、しかもBcl-xL蛋白質の発現をわずか10%前後増加させるインターロイキン3よりもはるかに強力であった。また、インターロイキン3は脳室内に直接投与しなければ神経細胞保護作用を示さないが、ジンセノサイドR

b₁は静脈内投与で脳の神経細胞を保護することが前記した静脈投与の実験（実施例1）で証明されているので、ジンセノサイドR b₁は末梢投与可能な非ペプチド性向神経薬物の中で目下の所、世界で唯一のB c l - x_L蛋白質の発現増強剤である。これまで非ペプチド性薬物がペプチド性因子（インターロイキン3）よりも強力なB c l - x_L蛋白質の発現増強を示すことは予想だにされなかった。ちなみに、神経細胞でのB c l - x_Lの発現をわずかながらも増強させるペプチド性因子は、本発明者らの知るかぎりインターロイキン3だけである。

ミトコンドリア関連蛋白であるB c l - x_LはA p a f 1と結合することにより、A p a f 1とプロカスパーゼ9（procaspase 9）との結合を阻害すると言われている（Adams J.M. and Cory S., Science, 281, 1322-1326, 1998）。B c l - x_L蛋白の減少あるいは機能低下が起きると、A p a f 1がB c l - x_L蛋白から解離し、ミトコンドリアからのチトクロームCの漏出とあいまって、プロカスパーゼ9が活性化されると考えられている（Adams J.M. and Cory S., Science, 281, 1322-1326, 1998）。ひとたび細胞質内のプロカスパーゼ9が活性化されると引き続いてカスパーゼ9（caspase 9）ならびにカスパーゼ3（caspase 3）が活性化され、これらの蛋白分解酵素により細胞は自己融解して死（アポトーシス）に至る過程が加速される。おそらく、プロカスパーゼ9が活性化された段階で、細胞が死に至る運命が決定される可能性が高いので、B c l - x_L蛋白の発現増加剤（ジンセノサイドR b₁）によりプロカスパーゼ9の活性化をくい止めることが、細胞死を防ぐための得策と考えられる。

さらに、ジンセノサイドR b₁による脳内のアポトーシス様神経細胞死の抑止効果を解析するために、実際に成熟脳で起こる病的なアポートシス様神経細胞死がジンセノサイドR b₁の投与により軽減されるかどうかをしらべた。モデル動物としてスナネズミの3分間前脳虚血モデルを用いた。同動物は、3分虚血負荷後1週間を経過すると海馬CA1領域錐体神経細胞が約半数変性脱落することが報告されている（Sakanaka M., et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 95, 4635-4640, 1998）。しかし、この時点で残った神経細胞でアポトーシス様細胞死の指標である核の断片化がさらに進行中であることを、T U N E L染色法により発明者らは確認している（Wen T.-C., et al., J.Exp.Med., 188, 635-649, 1998; Peng H., et al., J.C

ereb. Blood Flow Metab., 18, 349-360, 1998)。そこでこのモデル動物を用いて、3分虚血後7日目のアポトーシス様神経細胞死がジンセノサイドRb₁の脳室内投与により抑制されるかどうかをTUNEL染色法を用いて検討した。

吸入麻酔下でスナネズミに3分間の前脳虚血を負荷した直後に、脳室内へジンセノサイドRb₁を2.5ngまたは25ng単回注入し、その後ジンセノサイドRb₁(60ng/日または600ng/日)をミニ浸透圧ポンプを用いて1週間脳室内へ持続注入した。3分虚血後1週間目にスナネズミをペントバルビタール麻酔下で4%バラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液を用いて経心的に灌流固定し、脳を摘出した。摘出脳をバラフィンに包埋したのちに、5μmの厚みのバラフィン切片を作成し常法に従って、TUNEL染色を実施した。対照動物には同量の生理食塩水を投与した。

その結果を第10図に示す。第10図の(A)は対照動物を示し、(B)はジンセノサイドRb₁を60ng/日投与したものと示し、(C)はジンセノサイドRb₁を600ng/日投与したものと示す。

第10図(A)に示すことく、3分間の前脳虚血を負荷されたスナネズミの海馬CA1領域では1週間目に多くのTUNEL陽性神経細胞が出現し、同細胞がアポトーシス様細胞死の過程にあることがわかった。ジンセノサイドRb₁を3分間前脳虚血を負荷した直後から脳室内へ注入すると、60ng/日(第10図(B))、600ng/日(第10図(C))と注入用量に依存してTUNEL陽性神経細胞が有意に減少した(第10図(D))。このことは、実施例3、4での培養実験結果が成熟脳においても、あてはまるこことを示している。なお、ジンセノサイドRb₁は脳血流や脳温にはさしたる影響を与えないことがすでに報告されている(Lim J.-H., et al., Neurosci. Res., 28, 191-200, 1997; Zhang B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998)。

以上の実験結果から、ジンセノサイドRb₁又はその塩を含有してなる静脈内投与用製剤が極めて低濃度で、脳血管性痴呆、脳梗塞、脳卒中、一過性脳虚血発作などの脳・神経疾患の治療、予防又は処置に有効であることが明らかにされた。

また、低濃度、細胞外液濃度が1ng/ml以下、より詳細には1pg/ml

以下、さらには $1 \sim 100 \text{ f g}/\text{ml}$ という低濃度のジンセノサイド R b₁ 又はその塩がアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止する作用を有することが明らかになった。さらには、ジンセノサイド R b₁ 又はその塩が細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-xL の発現を促進させる作用を有することもわかった。

一方、本発明で使用されるジンセノサイド R b₁ 又はその塩は、薬用人蔘の成分として知られており、副作用の極めて少ない物質である。

したがって、本発明は、臨床上有効な脳・神経疾患の治療、予防又は処置剤を提供するものである。本発明の脳・神経疾患の治療、予防又は処置剤は、ジンセノサイド R b₁ 又はその塩の患部組織における細胞外液濃度が $1 \text{ ng}/\text{ml}$ 以下、より詳細には $1 \text{ pg}/\text{ml}$ 以下、更に詳細には $1 \sim 100 \text{ fg}/\text{ml}$ になるよう、に調製される静脈内投与用製剤が、特に好ましい。さらに具体的には、本発明は、ジンセノサイド R b₁ 又はその塩の患部組織における細胞外液濃度が $1 \text{ ng}/\text{ml}$ 以下、より詳細には $1 \text{ pg}/\text{ml}$ 以下、更に詳細には $1 \sim 100 \text{ fg}/\text{ml}$ になるよう、に調製される静脈内投与用製剤からなる脳・神経疾患の治療、予防又は処置剤、及び、脳細胞又は神経細胞保護剤を提供するものである。

実施例

次に、具体的な試験例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの具体例に限定されるものではない。

実施例 1 (ジンセノサイド R b₁ 静脈内注入実験)

12～13週齢の雄性 SH-S P ラット（体重 250～300 g）を使用した。同動物は 12 時間ごとの明暗サイクル室で飼育し、水ならびに餌は自由摂取とした。同動物の血圧は 203.1 ± 6.9 mmHg であり、以下の実験は愛媛大学医学部附属動物実験施設の動物実験指針に則ってなされた。吸入麻酔下で直腸温を 37 ± 0.2 °C に維持した SH-S P ラットの左中大脳動脈皮質枝 (MCA) を凝固・切離した。

MCA 永久閉塞の直後に左大腿静脈からジンセノサイド R b₁ の生理食塩水溶解液 ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ または $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) を $60 \mu\text{l}$ (ジンセノサイド R b₁ と

して $60 \mu\text{g}$ または $6 \mu\text{g}$) 単回注入した。その後、背部皮下に埋めたアルザミニ浸透圧ポンプと連結するカテーテルを、ジンセノサイド R b₁ 単回注入部位から左大腿静脈に挿入・留置した。あらかじめ、同ミニ浸透圧ポンプには、ジンセノサイド R b₁ の生理食塩水溶解液を満たしておき、ジンセノサイド R b₁ $60 \mu\text{g}$ / 日または $6 \mu\text{g}$ / 日の用量で左大腿静脈から 28 日間持続注入した。なお、ジンセノサイド R b₁ 溶液の流量は $0.25 \mu\text{l}/\text{時}$ であった。MCA を永久閉塞した対照動物（虚血コントロール動物）と偽手術動物には同量の生理食塩水のみを投与した。

MCA 永久閉塞後、常法に従って (Zhang B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998) 2 週目と 4 週目にそれぞれ 4 日間水迷路テストを実施し、SH - SP ラットの場所学習能力を判定した。

その結果を第 1 図に示す。第 1 図の左側は 2 週目の結果であり、同右側は 4 週目の結果である。また、第 1 図中の黒丸印 (●) は偽手術をしたラットのものであり、白丸印 (○) は手術後生理食塩水のみを投与したものであり、黒四角印 (■) はジンセノサイド R b₁ を $6 \mu\text{g}$ / 日投与したものであり、白四角印 (□) はジンセノサイド R b₁ を $60 \mu\text{g}$ / 日投与したものである。データは平均値土標準誤差で示されており、統計解析法は ANOVA + Fisher の PLSD によっている。

なお、SH - SP ラットの水泳速度には各群で有意差はみられなかった。

4 週目の水迷路テスト終了後に、SH - SP ラットを抱水クロラールにて麻酔し、4% バラホルムアルデヒドを含有する 0.1 モルリン酸緩衝液で経心的に灌流固定した。その後、同動物の脳を摘出し大脳皮質梗塞巣の写真を撮影した。左大脳半球面積と左大脳皮質梗塞面積を、写真上で画像解析装置を用いて計測し、左大脳皮質梗塞面積を左大脳半球面積で除することにより大脳皮質梗塞比率 (%) を算出した。その結果を第 2 図に示す。データは平均値土標準誤差で示されており、統計解析法は Mann - Whitney U テストによっている。

第 3 図 A に生理食塩水投与脳梗塞巣、第 3 図 B にジンセノサイド R b₁ ($6 \mu\text{g}$ / 日) 投与脳梗塞巣の実例を示す。

また、第 4 図に本実験結果をまとめた模式図を示す。生理食塩水投与群では脳

梗塞病巣部の大きさが大きいままであり、水迷路テストにおいては目的のプラットホームに到達するまでに時間を要しているのに対して、本発明のジンセノサイドR b₁投与群においては病巣部が回復、縮小されており、この結果水迷路テストにおいては目的のプラットホームに短時間で到達している。

実施例2 (ジンセノサイドR b₁)による神経細胞膜脂質の過酸化防止効果判定

実験) :

胎生17日目ラット大脳皮質神経細胞を、無血清培養液中で3日間維持した後、ジンセノサイドR b₁を0.1 f g / m l、1 f g / m l、10 f g / m l、100 f g / m l、及び1000 f g / m l含むかまたは含まない(0 f g / m l)新鮮な培養液に交換しさらに、48時間培養した。その後、硫酸第一鉄とアスコルビン酸を含みジンセノサイドR b₁を含まない新鮮な培養液に交換して2時間維持し、ヒドロキシルラジカルを発生させ神経細胞膜に酸化傷害を与えた。産生した神経細胞膜過酸化脂質は、ドデシル硫酸ナトリウムにより細胞を溶かしたのち、チオバルビツール酸(TBA)の固定量を吸光度測定することにより求められた。

その結果を第5図に示す。この結果、ジンセノサイドR b₁による神経細胞膜脂質過酸化防止効果は100 f g / m lの濃度でのみわずかに認められたが、硫酸第一鉄によるフリーラジカル傷害を軽減する0.1~10 f g / m lの濃度域では、脂質過酸化防止効果は認められなかった。

実施例3 (ジンセノサイドR b₁)による神経細胞死(アポトーシス)抑制作用

判定実験) :

胎生17日目ラット大脳皮質神経細胞を無血清培地で4日間ないし5日間維持した後、ジンセノサイドR b₁を1 f g / m l、100 f g / m l、及び、100 p g / m l含むか、または含まない(0 f g / m l)新鮮な培地に交換し、24時間培養した。その後、一酸化窒素供与体ニトロブルシッドナトリウム(SNP)を100 μMの濃度で培地中に10分間添加した。その後、さらにジンセノサイドR b₁を含む培養液中で16時間神経細胞を維持し、細胞生存率を酸化還元色素のアラマーブルーを用いて測定した。

その結果を第6図に示す。第6図の左側は、S N P処理のない場合の結果を示し、この結果、ジンセノサイドR b₁は神経細胞の活性に大きな影響を与えないことがわかる。第6図の右側はS N P処理を行った場合のものであり、黒く塗りつぶされているものはS N P処理の前後にジンセノサイドR b₁が添加されたものであり、斜線が引かれているものは、S N P処理後にジンセノサイドR b₁が添加されたものである。データは平均値±標準誤差で示されており、統計解析法はA N O V A + F i s h e r の P L S D によっている。アステリスクは、ジンセノサイドR b₁が添加されないときに対する有意差（*はP<0.05を、**はP<0.01）を示す。

第6図に示されるごとく、一酸化窒素供与体ニトロブルシッダナトリウム（S N P）の処理がないときには、ジンセノサイドR b₁は、培養神経細胞の代謝活性に有意な影響を与えない。S N P処理を行うと、神経細胞死（アポトーシス）が起こるが、ジンセノサイドR b₁は1～100 f g / m lの濃度域でS N P処理前後および処理後に投与した場合でも神経細胞のアポトーシスを有意に抑止したことがわかる。

実施例4（ジンセノサイドR b₁のB c l - x₁発現作用解析実験）：

ジンセノサイドR b₁がB c l - x₁遺伝子の発現を増加させるかどうかをしらべるために、温らの論文（Wen T.-C., et al., J.Exp.Med., 188, 635-649, 1998）に記載の方法に準じて、0 f g / m l、1 f g / m l、及び、100 f g / m lのジンセノサイドR b₁で、24時間前処理された培養神経細胞から総RNAを抽出した。D N a s e 処理済の総RNA 3 μgから、オリゴd T プライマーと逆転写酵素（Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase）を用いてc D N Aを生成した。遺伝子增幅反応（P C R）によりこれを増幅した。このP C RはT a q ポリメラーゼを用いて以下の条件で行った。すなわち、（1）94°C、2分間、（2）94°C、1.5分間；55°C、1.5分間；72°C、2分間を1サイクルとし、B c l - x₁に関しては25サイクル、β-アクチンに関しては20サイクル、（3）72°C、2分間である。

P C R産物を、3%アガロースゲルにて泳動し、エチジウムプロマイド染色

によって可視化した。なお、内部標準として β -アクチンのmRNAの発現を用いた。その結果を第7図に示す。

また、Bcl-xL蛋白質の神経細胞での発現をジンセノサイドRb₁が増強するかどうか調べるため、抗Bcl-xL蛋白質抗体を用いてウエスタンプロット法を実施した。ジンセノサイドRb₁存在下または非存在下で、ラット大脳皮質神経細胞を48時間培養後、電気泳動用サンプル緩衝液で細胞を溶解し、電気泳動を実施した。その後泳動物をニトロセルロース膜に転写しウエスタンプロットを行った。その結果を第8図に示す。

さらに、抗Bcl-xL蛋白質抗体と反応するバンドを画像解析装置で定量化した。その結果を第9図に示す。統計解析法はANOVA + FisherのPLSDによっている。図中のアスタリスクは、ジンセノサイドRb₁が添加されないときに対する有意差（＊＊は $P < 0.01$ ）を示す。

第7図に示すことく、1fg/mlあるいは100fg/mlのジンセノサイドRb₁で処理された培養神経細胞では、Bcl-xLのmRNAの発現がコントロールに比べて増加していた。一方、ジンセノサイドRb₁は神経細胞死抑止効果を発揮する1～100fg/mlの濃度域で、神経細胞のBcl-xL蛋白質発現量を約50%有意に増加せしめた（第9図参照）。

実施例5（ジンセノサイドRb₁による脳内アボトーシス様神経細胞死抑止効果の解析）

吸入麻酔下でスナネズミに3分間の前脳虚血を負荷した直後に、脳室内ヘジンセノサイドRb₁を2.5ngまたは25ng単回注入し、その後ジンセノサイドRb₁（60ng/日または600ng/日）をミニ浸透圧ポンプを用いて1週間脳室内へ持続注入した。3分虚血後1週間目にスナネズミをペントバルビタール麻酔下で4%バラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液を用いて経心的に灌流固定し、脳を摘出した。摘出脳をバラフィンに包埋したのちに、5μmの厚みのバラフィン切片を作成し常法に従って、TUNEL染色を実施した。対照動物には同量の生理食塩水を投与した。

その結果を第10図に示す。第10図（D）の統計解析法はMann-Whi

tney Uテストによっている。第10図の(A)は対照動物を示し、(B)はジンセノサイドRb₁を60ng/日投与したものを示し、(C)はジンセノサイドRb₁を600ng/日投与したものを示す。

第10図(A)に示すことく、3分間の前脳虚血を負荷されたスナネズミの海馬CA1領域では1週間目に多くのTUNEL陽性神経細胞が出現し、同細胞がアポトーシス様細胞死の過程にあることがわかった。ジンセノサイドRb₁を3分間前脳虚血を負荷した直後から脳室内へ注入すると、60ng/日(第10図(B))、600ng/日(第10図(C))と注入用量に依存してTUNEL陽性神経細胞が有意に減少した(第10図(D))。このことは、実施例3、4での培養実験結果が成熟脳においても、あてはまるこことを示している。なお、ジンセノサイドRb₁は脳血流や脳温にはさしたる影響を与えないことがすでに報告されている(Lim J.-H., et al., Neurosci. Res., 28, 191-200, 1997; Zhang B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998)。

産業上の利用可能性

本発明は、低濃度のジンセノサイドRb₁の静脈内投与用製剤からなる極めて有効な、急性期・慢性期の脳梗塞のみならず脳出血・クモ膜下出血・脳塞栓の急性期や慢性期あるいは一過性脳虚血発作などに対する、脳・神経疾患の治療、予防剤、及び、神経保護薬を提供する。すなわち、ジンセノサイドRb₁に関する本発明は、脳卒中が疑われる患者に対して救急車の中でも点滴静注が可能な薬物を提供するものである。実際の急性期脳卒中症例では、発症後2週間以内に病変が進行することが多いので、この期間(たとえば1日間あるいは14日間)だけでも本発明のジンセノサイドRb₁を投与すれば充分効果が期待できる。また、ジンセノサイドRb₁の実用化により、脳卒中患者の脳血管再建術・再灌流術への適応も広がる。

さらに、本発明の医薬組成物は、Bcl-xL蛋白質の発現増強作用を有し、アポトーシス様神経細胞死を伴うその他の一次性および二次性神経変性疾患(アルツハイマー病、ピック病、脊髄小脳変性症、バーキンソン病、舞蹈病、線内障、

筋萎縮性側索硬化症、老人性黄斑変性症、エイズ脳症、肝性脳症、糖尿病性網膜症、脳炎、脳性マヒ、網膜剥離、頭部外傷、脊髄損傷、脱髓疾患、新生児仮死、末梢神経障害、網膜色素変性症、等）などにも有効であるとされる。

また、本発明の医薬組成物は副作用がほとんど無く、安全性の高い薬物を提供するものである。

本発明は、過去に類を見ない低濃度でジンセノサイドR_b₁がBcl-x_L蛋白質の増加を促すことによりアボトーシスあるいはアボトーシス様細胞死を抑止する作用を有することを見出したものであり、このことはジンセノサイドR_b₁が単に中枢神経疾患のみならずアボトーシス又はアボトーシス様細胞死を伴う末梢組織の疾患（たとえば、臓器移植後の拒絶反応、心不全、心筋症、心筋・肝臓・腎・臓の虚血再灌流障害、舌痛症、心筋梗塞、放射線障害、末梢動脈閉塞症、末梢循環不全、褥創、角膜損傷、自己免疫病、免疫不全病）あるいは移植用臓器・組織の保護にも有効であることを示唆している。これら末梢組織の疾患に対しては、神経疾患に使用される用量よりも少ない量のジンセノサイドR_b₁で充分な効果・効能が期待される。また、本発明の医薬組成物は、静脈内投与のみならず、点鼻薬、吸入薬、舌下錠、坐薬、局所注入剤、皮膚外用剤、経口投与剤、点眼薬、局所塗布剤、筋肉注射薬、皮下注射剤、皮内注射薬としても使用可能である。さらに、消化管での分解を阻止する担体あるいは消化管での吸収を促進する担体にジンセノサイドR_b₁を混入・封入又は結合させたのちに、本発明の医薬組成物を経口投与剤として使用することもできる。

請求の範囲

1. ジンセノサイド R b₁又はその塩、及び、静脈内投与用の担体からなる医薬組成物。
2. ジンセノサイド R b₁又はその塩の患部における細胞外液濃度が 1 n g / m l 以下となる請求の範囲第 1 項に記載の医薬組成物。
3. 細胞が、脳細胞又は神経細胞である請求の範囲第 2 項に記載の医薬組成物。
4. 単回静脈内注入用製剤又は静脈内持続投与用製剤である請求の範囲第 1 ~ 3 項のいずれかに記載の医薬組成物。
5. 細胞死抑制遺伝子産物 B c 1 - x₁の発現を促進させるための医薬組成物である請求の範囲第 1 ~ 4 項のいずれかに記載の医薬組成物。
6. アポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用の医薬組成物である請求の範囲第 1 ~ 4 項のいずれかに記載の医薬組成物。
7. 脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物である請求の範囲第 1 ~ 4 項のいずれかに記載の医薬組成物。
8. 脳・神経疾患が、脳血管性痴呆、脳梗塞、脳卒中又は一過性脳虚血発作である請求の範囲第 7 項に記載の医薬組成物。
9. ジンセノサイド R b₁又はその塩を含有してなる脳・神経疾患の治療、予防又は処置剤。
10. 脳・神経疾患が、脳血管性痴呆、脳梗塞、脳卒中又は一過性脳虚血発作である請求の範囲第 9 項に記載の治療、予防又は処置剤。
11. ジンセノサイド R b₁又はその塩を含有してなる脳細胞又は神経細胞保護剤。
12. ジンセノサイド R b₁又はその塩を含有してなる細胞死抑制遺伝子産物 B c 1 - x₁の発現促進剤。
13. ジンセノサイド R b₁又はその塩を含有してなるアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止剤。
14. ジンセノサイド R b₁又はその塩の患部における細胞外液濃度が 1 n g / m l 以下となる請求の範囲第 9 ~ 13 項のいずれかに記載の治療、予防又は処置剤。
15. ジンセノサイド R b₁又はその塩のその濃度が 1 ~ 1 0 0 f g / m l である

請求の範囲第14項に記載の治療、予防又は処置剤。

16. ジンセノサイドR b; 又はその塩の有効量を投与してなる脳・神経疾患を治療、予防又は処置する方法。

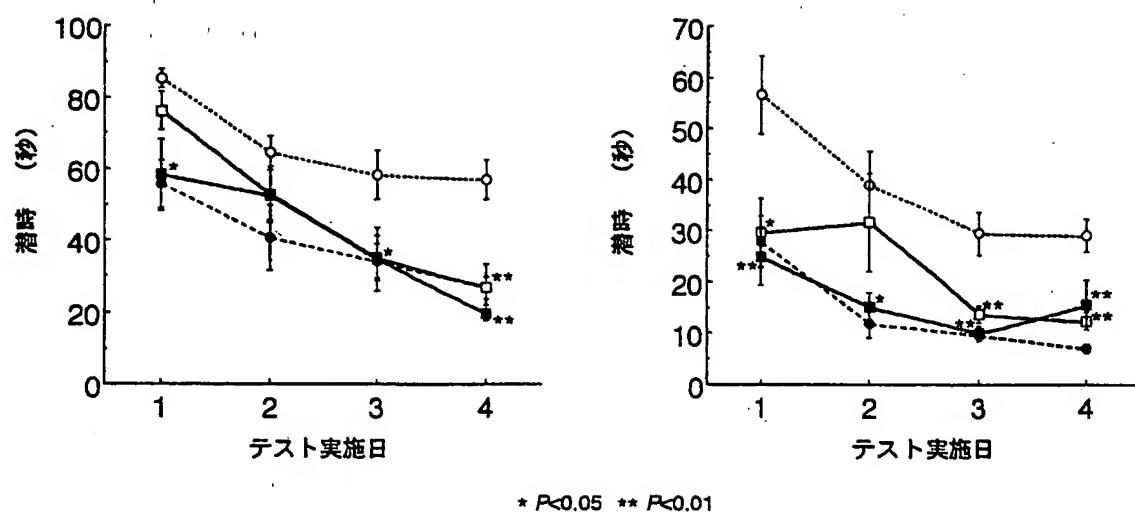
17. 脳・神経疾患が、脳血管性痴呆、脳梗塞、脳卒中又は一過性脳虚血発作である請求の範囲第16項に記載の治療、予防又は処置する方法。

18. 投与が静脈内投与である請求の範囲第16又は17項に記載の治療、予防又は処置する方法。

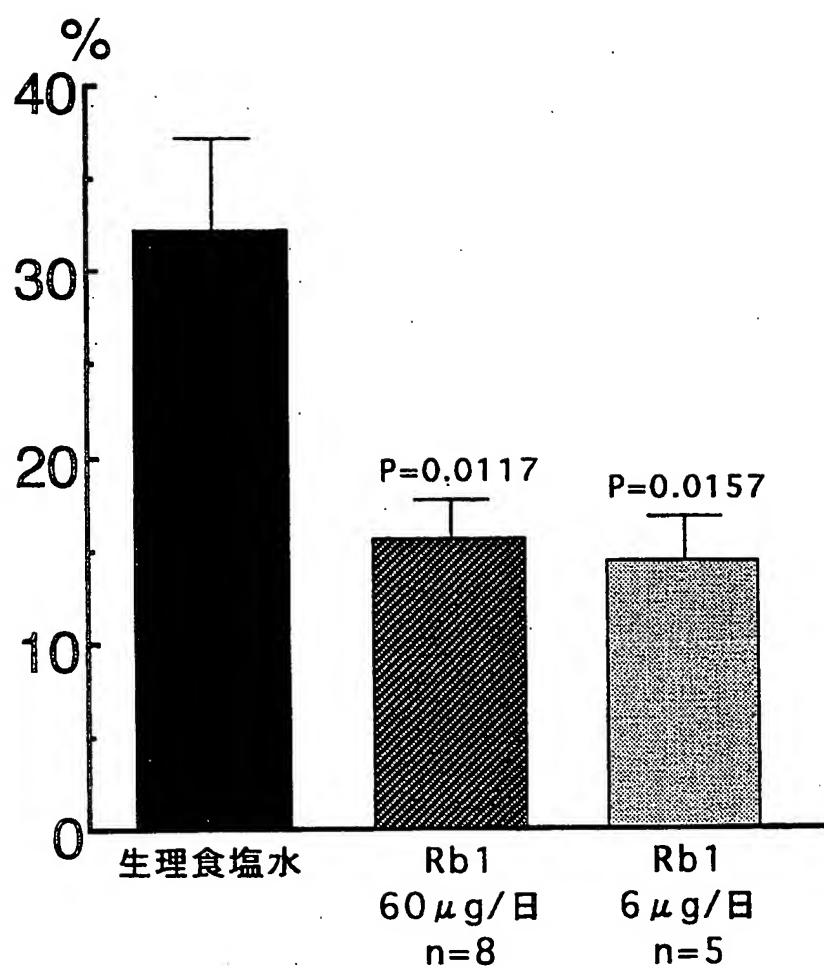
19. ジンセノサイドR b; 又はその塩の、脳・神経疾患を治療、予防又は処置剤の製造のための使用。

20. 治療、予防又は処置剤が静脈内投与製剤である範囲第19項に記載の使用。

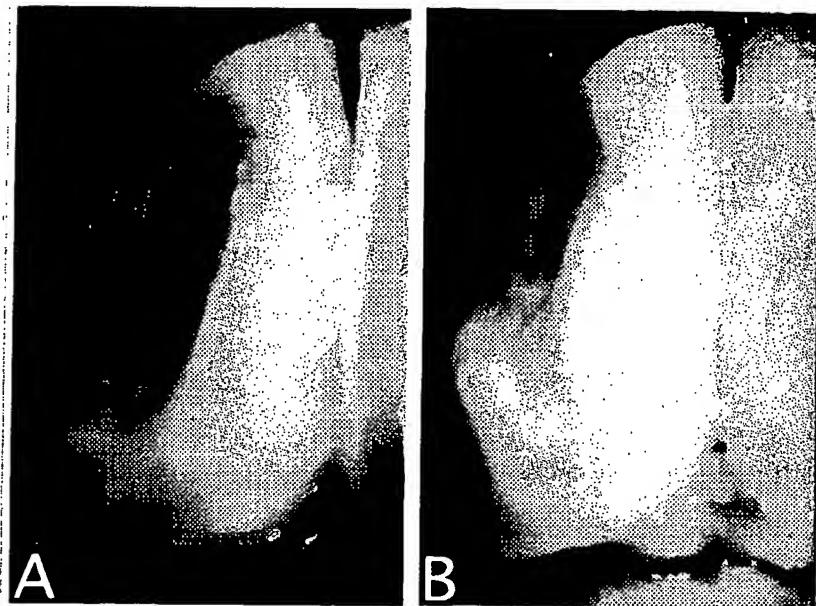
第 1 図



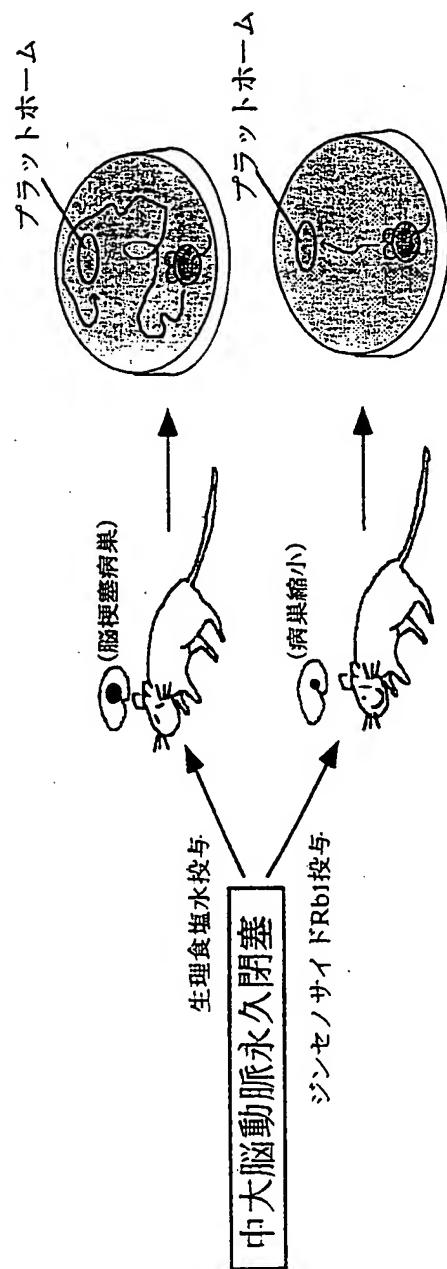
第 2 図



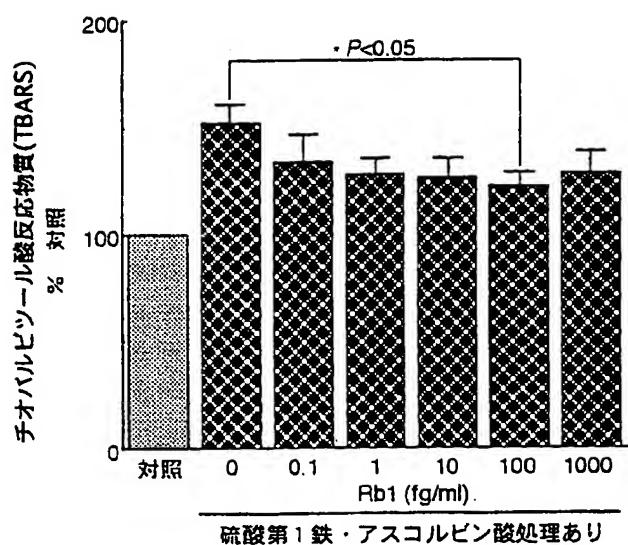
第 3 図



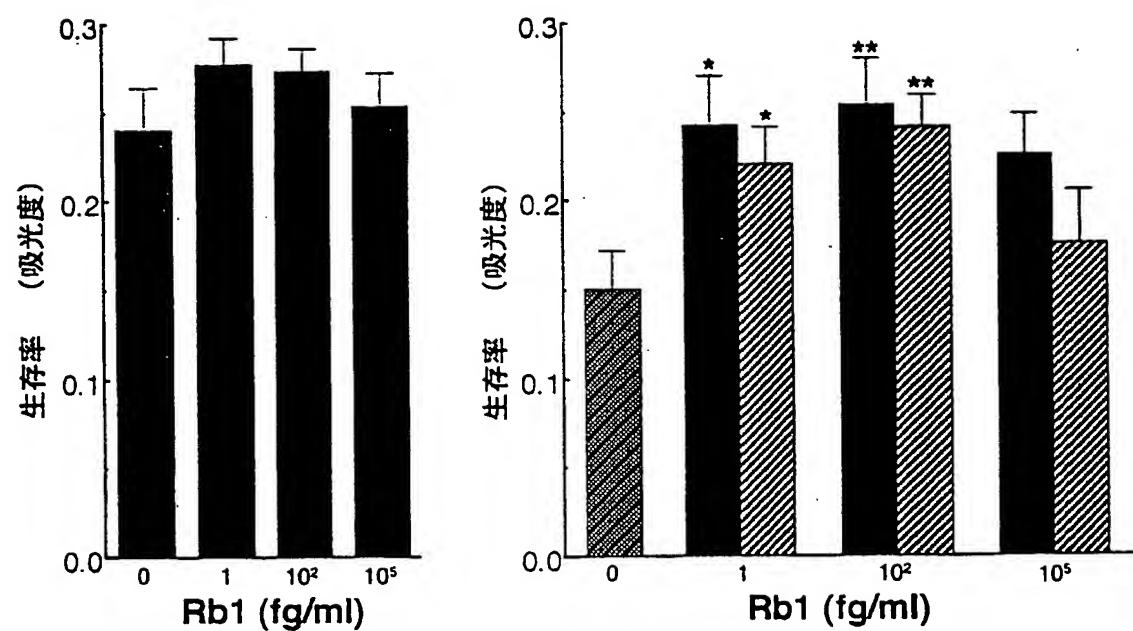
説 + 図



第 5 図

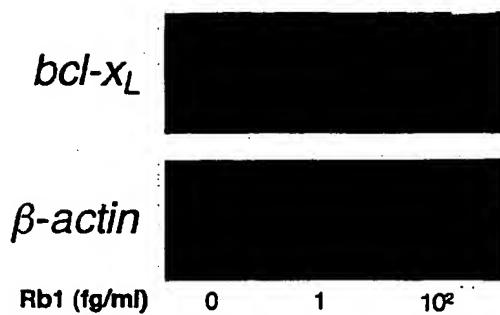


第 6 図

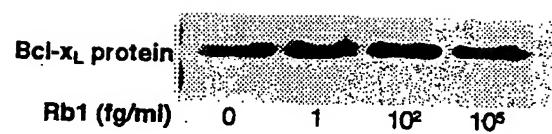


* P<0.05 ** P<0.01 vs Rb1=0 fg/ml

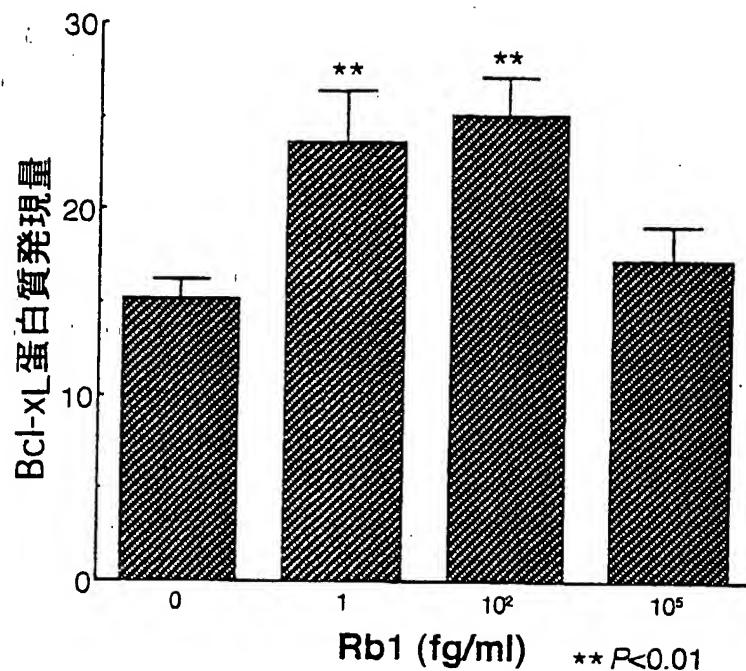
第 7 図



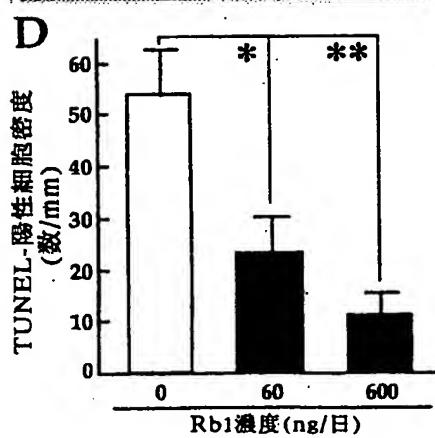
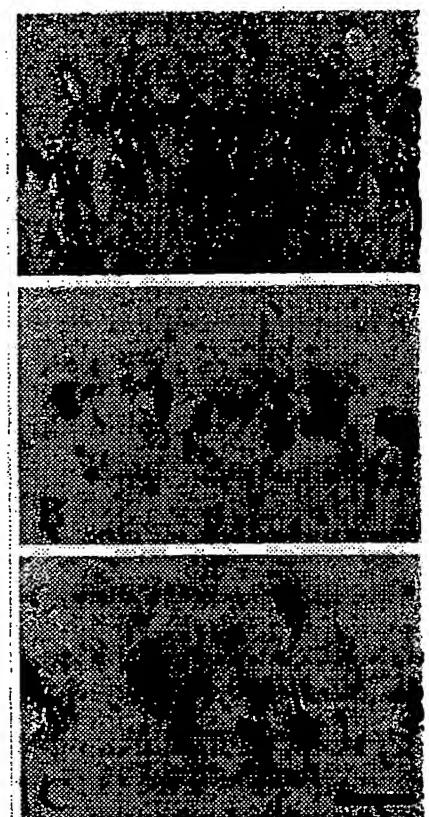
第 8 図



第 9 図



第 10 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02550

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C07J17/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07J17/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 8-208688, A (NEOS Co., Ltd.), 13 August, 1996 (13. 08. 96) (Family: none)	1-15, 19-20
A	JP, 7-89863, A (Roussel Morishita Co., Ltd.), 4 April, 1995 (04. 04. 95) (Family: none)	1-15, 19-20
A	JP, 61-30599, A (K.K. Oosaka Yakuhin Kenkyuusho), 12 February, 1986 (12. 02. 86) (Family: none)	1-15, 19-20

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

*A" Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 28 May, 1999 (28. 05. 99)	Date of mailing of the international search report 8 June, 1999 (08. 06. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No	Telephone No

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02550

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 16-18

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 16 to 18 substantially pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02550

Continuation of Box No. I of continuation of first sheet (1)

the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl. C07J 17/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl. C07J 17/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 8-208688, A (株式会社ネオス), 13.8月.1996(13.08.96), (ファミリーなし)	1-15, 19-20
A	J P, 7-89863, A (森下ルセル株式会社), 4.4月.1995(04.04.95), (ファミリーなし)	1-15, 19-20
A	J P, 61-30599, A (株式会社 大阪薬品研究所), 12.2月.1986(12.02.86), (ファミリーなし)	1-15, 19-20

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 - 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 - 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 - 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 - 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願
- の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 05. 99

国際調査報告の発送日

08.06.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

弘賀 謙二

印

印

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

第一欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 16-18 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 16-18 は、実質的に治療による人体の処置方法に関するものであつて、PCT第17条(2)(a)(i) 及びPCT規則39.1(iV)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であつてPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従つて記載されていない。

第二欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかつた。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。